

**Über die spezifisch stoffwechselsteigernde
Wirkung von Organextrakten in vitro**

Dr. Hannes W. Kalb

Aus dem Pathologischen Institut der Universität München

Direktor: Prof. Dr. W. Büngeler

Über die spezifisch stoffwechselsteigernde Wirkung
von Organextrakten in vitro

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt

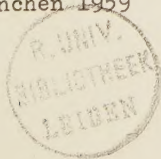
von

Dr. Hannes W. Kalb

aus

München

München 1959



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Privatdozent Dr. Dr. H. Wrba

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Büngeler

Dekan: Prof. Dr. K. Kolle

Tag der mündlichen Prüfung: 25.6.1959

Über die spezifisch stoffwechselsteigernde Wirkung
von Organextrakten in vitro

- I. Einleitung und Problemstellung
- II. Material und Methode
- III. Experimentelle Ergebnisse
 - A) Allgemeine Versuche über die Aufnahme von radioaktivem Phosphat durch Organe in der Gewebekultur
 - B) Die Aufnahme von radioaktivem Phosphat in Kulturen erwachsener und embryonaler Rattenleber und ihre Beeinflussung durch Homogenisate embryonaler Organe und Organpräparate
 - C) Die Aufnahme von radioaktivem Phosphat in Kulturen erwachsener und embryonaler Rattenleber und ihre Beeinflussung durch das Serum von Ratten, die mit embryonalen Rattenorgan-Homogenisaten vorbehandelt worden waren
 - D) C^{14} -markiertes Adenin als Testsubstanz für wachsende Gewebekulturen
 - E) Versuch zum Ausbau einer exakten Messmethode für Rollerkulturen
- IV. Diskussion der Versuchsergebnisse
- V. Zusammenfassung
- VI. Literaturverzeichnis

Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. Einleitung und Problemstellung

Seit einigen Jahren fanden therapeutische Versuche in verstärktem Masse Eingang in Praxis und Klinik, die sich unter dem Begriff der sogenannten Gewebetherapie zusammenfassen lassen. Unter Gewebetherapie sei dabei vor allem die heteroplastische und homoioplastische Transplantation von bestimmten Organen bzw. die Übertragung von Organpartikel-Suspensionen durch Injektion verstanden.

Die empirisch gefundene Organtherapie ist schon sehr alt, ihre Spuren reichen bis in die graue Vorzeit. So ist z.B. die Placentophagie bei vielen Tierarten beobachtet worden, aber auch von primitiven Völkerstämmen bekannt. Transplantationen in unserem heutigen Sinn wurden schon nachweislich von H i p p o k r a t e s vorgenommen, der z.B. Stücke von Froschhaut implantierte.

In seinem Werk " Historia Naturae " erwähnt P l i n i - u s ³² den Gebrauch von Organteilen oder -Extrakten zu therapeutischen Zwecken bei verschiedenen Erkrankungen.

Chinesische Ärzte verwenden seit dem 3.Jahrhundert unserer Zeitrechnung die Placenta als biologisches Stimulans (H u a n g - M o n g - L u o n g u. T u a n - t i e n - H y ²¹).

In Deutschland war es vor allem im 15.Jahrhundert P a r a - c e l s u s ²⁹, der in seiner berühmten Abhandlung " Von der

Mumie " Technik und Zweck einer Gewebetherapie behandelt. Schon geringe implantierte Gewebemengen sollen nach ihm genügen, um dem Kranken ihre tiefgreifenden Kräfte verspüren zu lassen. Auf P a r a c e l s u s geht auch die Hypothese " Similia similibus curantur " zurück.

Zu Beginn des 19. Jahrhunderts wurde das Problem der Implantation von Gewebe hauptsächlich unter dem Aspekt der plastischen Operation studiert. So löste die epochemachende Entdeckung des Marburger Anatomen und Chirurgen B ü n g e r 1818, der den Hautdefekt eines Lupuskranken mit gesunder Haut vom Obärschenkel des Patienten abheilte, eine Fülle experimenteller Beobachtungen über die Gesetze der Transplantation aus (M a r c h a n d ²⁷).

1849 entfernte der Göttinger Physiologe B e r t h o l d ¹ bei Hähnen die Hoden und konnte zeigen, dass durch Hodenimplantation die Kastrationsfolgen behoben werden konnten. Dieses Experiment wurde zur Grundlage einer ganzen medizinischen Disziplin, der Endokrinologie.

1857 hat C l a u d e B e r n a r d den Begriff der sogenannten Inneren Sekretion geschaffen und einige Jahre später haben die Versuche von B r o w n - S é q u a r d, S t e i n a c h und V o r o n o f f die Öffentlichkeit bewegt.

Von den letztgenannten Beobachtungen wissen wir heute, dass sie auf bestimmte, körpereigene Wirkstoffe, die Hormone zurückzuführen sind. Was wir aber heute unter dem geklärten

Begriff " Hormon " der Endokrinologie einreihen, war damals Gewebetherapie. Die Verwendung des komplexen, heterogenen Gewebematerials hat sich erübrigt, als man lernte, die spezifisch wirksamen Stoffe vom Zellballast abzutrennen, sie womöglich zu kristallisieren und ihre Konstitution aufzuklären.

Die Gewebetherapie unserer Zeit arbeitet u.a. mit frisch entnommenen bzw. gefriergetrockneten, stark zerkleinerten embryonalen oder jugendlichen Organen, die in Suspension durch Injektion übertragen werden. Dabei geht man von der Vorstellung aus, dass durch die Übertragung bestimmter Organzellen im korrespondierenden Organ stimulierte bzw. regenerative Prozesse ausgelöst werden, die vor allem bei insuffizienten Organen eine Heilung herbeiführen sollen.

Wie dieser kurze historische Überblick zeigt, hat sich seit Jahrtausenden die Vorstellung einer dem Gewebe innewohnenden lokalen, induzierenden Kraft erhalten.

In diesem Punkt berührt sich nun die Problematik einer " Gewebetherapie " eng mit einem zentralen Problem der experimentellen Biologie, der Frage nach der Existenz lokaler Wachstums- und Stoffwechselfaktoren. Die Bearbeitung dieses Problems ist vor allem durch die Erkenntnisse über das autonome Wachstum von Tumoren gefördert worden.

So nimmt z.B. W e i s s^{39,40} in seiner Theorie des Wachstums an, dass die Zelle spezifische wachstumsstimulierende

Potenzen enthält, die unter normalen Verhältnissen in einem Gleichgewicht mit extra-zellulären Wachstums-Hemmstoffen stehen.

Auch T e i r ^{34,35} vermutet ein Stimulator-Hemmstoff-System, das nach seinen Vorstellungen intrazellulär lokalisiert ist und sich nach Abschluss der Wachstumsperiode im Gleichgewicht befindet. Darüber hinaus soll dieses System von einem übergeordneten System, dem als Hauptkomponenten die Hypophyse, die Schilddrüse, die Nebennieren, die Keimdrüsen und die Thymusdrüse angehören, kontrolliert werden. Unter normalen Umständen sind die Impulse dieser beiden Systeme miteinander im Gleichgewicht. Eine Störung dieses Gleichgewichts führt zu lokalem, unkontrolliertem Wachstum.

Es gibt nun eine ganze Reihe von experimentellen Untersuchungen, die eine Annahme lokaler Wachstumsfaktoren rechtfertigen. Eine erste entsprechende Beobachtung wurde 1942 von W e i s s und W a n g ⁴¹ gemacht, als sie beobachten konnten, dass ein Stück Leber auf die Chorion-Allantois-Membran des Hühnchenembryos gebracht eine deutliche Beschleunigung des Leberwachstums im Embryo hervorruft. Der induzierende Faktor wurde offensichtlich auf dem Blutweg transportiert.

Ähnliche Untersuchungsergebnisse liegen für die Injektion verschiedener Gewebe-Homogenisate vor. So konnte z.B. nach der Injektion von Haut (M c J u n k i n und M a t s u i ²⁶,

Teir, Kiljunen und Putkonen³⁶), von Orbital-Drüsen (Teir³⁵) und von Leber (Teir und Ravanti³⁷) eine Erhöhung der Mitosezahlen im homologen Organ beobachtet werden. Mc Junkin und Breuhau²⁵ fanden die Zahl der Mitosen in regenerierender Leber deutlich erhöht, wenn sie zwei Tage nach partieller Hepatektomie Lebergewebe injezierten. Die Untersuchungen von Marshak und Walker^{28,29} bringen diesen Effekt mit der Chromatin-Fraktion der Leber in Zusammenhang. Zak⁴⁶ injizierte Ratten das abzentrifugierte Sediment von Leber-Homogenisaten und fand spezifisch die Mitosenzahl in der Leber der Versuchstiere erhöht. Weiler⁴² erhielt durch Zentrifugieren von Leber-Homogenisaten bei 55.000 R.P.M. eine Fraktion, der organspezifische Antigen-Eigenschaften zukamen und Butenandt⁹ diskutiert die Frage, in wie weit diese spezifischen Antigene mit einer Erhöhung der Mitosezahlen und der Wachstumsregulierung in Verbindung zu bringen sind.

Nach oftmals wiederholten Injektionen von Organ-Homogenisaten, z.B. der Haut, konnte die Entstehung von Tumoren beobachtet werden (Teir, Voutilainen und Kiljunen³⁸). Durch häufige Injektionen von Homogenisaten regenerierender Leber konnte Blomquist² analoge Resultate erzielen.

Diese kurze Auswahl mag genügen, die allgemeine Problemstellung der vorgelegten Arbeit im Rahmen der experimentellen Biologie zu umreißen.

Die angeführten Untersuchungsergebnisse wurden nun alle am lebenden Organismus, d.h. an einem biologischen System mit Regulation und Gegenregulation gewonnen. Die Möglichkeit zu verwaschenen Effekten liegt hierbei sehr nahe. Es schien deshalb reizvoll, den Versuch zu unternehmen experimentelle Bedingungen zu schaffen, mit deren Hilfe es vielleicht möglich sein könnte, genauere Vorstellungen über die Wirkung von Organzellen zu gewinnen. Die Methode der Wahl bot sich dafür in der Gewebekultur mit ihren verschiedenen Variationsmöglichkeiten an.

Als erstes Problem trat dabei die Frage nach einer exakten Messmethode von Wachstumsvorgängen bzw. des aktivierten Stoffwechsels auf. Dieses Problem, das allgemein als die " crux " einer vergleichenden Gewebekultur bekannt ist (siehe u.a. P a r k e r ³¹) schien mit Hilfe radioaktiver Isotope angebar. Folgende Vorstellungen waren dabei massgebend:

Zellregeneration und Wachstum sind, wie alle Lebensvorgänge, der morphologische Ausdruck sich im molekularen Bereich abspielender biochemischer Reaktionen bzw. Reaktionsfolgen. Das heisst, der Gewinn oder Verlust an Substanz definiert sich aus dem Verhältnis von aufbauenden zu abbauen-

den Reaktionen, im Fall der einzelnen Reaktion aus dem Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten, die durch den Umsatz pro Zeiteinheit in den beiden Richtungen gegeben sind.

$$K = \frac{k_1}{k_2},$$

wobei K die Gleichgewichtskonstante ist, k_1 bzw. k_2 die Geschwindigkeitskonstanten der Hin- bzw. Rückreaktion. K ist der Repräsentant der Gleichgewichtslage.

Als Wachstum lassen sich dann Vorgänge charakterisieren, deren Gleichgewichtskonstanten gegenüber der Norm vergrößert sind, während Regenerationsvorgängen eine Angleichung von der negativen Seite her zur Norm entspricht.

Die tierische und pflanzliche Zelle wird uns als koordiniertes System von Kohlehydraten, Fetten, Eiweisstoffen, Nucleinsäuren, Wasser u.a.m. sichtbar. Ein Kriterium für den Stoffwechsel dieser so verschiedenartigen Stoffgruppen wäre deshalb für eine Beobachtung von Wachstumsvorgängen besonders wichtig.

Eine zentrale Stellung im Umsatzgeschehen all dieser Verbindungen nimmt nun die Phosphorsäure ein. Da jeder aufbauende Vorgang mit dem Verlust an Entropie verbunden ist, wird für ihn Energie benötigt. Diese Energie liefert der intermediäre Stoffwechsel durch die Verbrennung von Kohlehydraten, Fett und Eiweiss hauptsächlich in den Elementarvorgängen der

Gärung und der Atmung über die Stufe der sogenannten energiereichen Verbindungen. Unter diesen energiereichen Verbindungen spielen nun phosphorsäurehaltige Substanzen eine so dominierende Rolle, dass man den Umsatz an Phosphat - mit gewissen Einschränkungen - als Mass für die Aktivität des Zellstoffwechsels ansehen darf. So haben z.B. schon 1943. H e v e s y und O t t e s e n ¹⁹ den Umsatz von Nucleinsäuren bestimmter Organe in lebenden Organismen aus der Geschwindigkeit ermittelt, mit der radioaktives Phosphat in sie eingebaut wird. Besonders die Nucleinsäuren spielen aber eine wesentliche Rolle bei der Eiweissynthese, also der Bildung von zellulärer Gerüstsubstanz, denn so lange Eiweiss umgesetzt wird, werden auch Nucleinsäuren umgesetzt. Beide Umsätze steigen und sinken parallel zueinander, allerdings mit gelegentlich geringen zeitlichen Verschiebungen (u.a. F e l i x ¹¹). Die Zunahme vor allem an Ribonucleinsäure wird von verschiedenen Autoren als Ausdruck echter Wachstums- bzw. Regenerationsvorgänge angesehen.

Wie schon oben erwähnt und an Hand folgenden Schemas gezeigt werden soll, ist die Synthese von Nucleinsäuren mit der Aufnahme von Phosphorsäure, dem Vorhandensein von energiereichen Verbindungen, verknüpft.

Schema zur Biosynthese eines Polynucleotids

I. Anorganisches Phosphat

Glykolyse ↓ Atmung

Energiereiches Phosphat: vor allem Adenosintri-
phosphat (ATP)

$$\begin{array}{ccc} \text{II.} & \text{Adenosintriphosphat (ATP) + Adenosinmonophosphat (AMP)} & \\ & \downarrow \text{Myokinase} & \\ & 2 \text{ Adenosindiphosphat (2 ADP)} & \end{array}$$

Auf Grund dieser Überlegungen lag es nahe, zu versuchen, die Methode von H e v e s y und O t t e s e n ¹⁹ auf die Gewebekultur zu übertragen, um aus der verschiedenen Aufnahme von radioaktivem Phosphat durch bestimmte Gewebe Aufschlüsse über ihre Stoffwechsel- und Syntheseleistungen zu gewinnen. Ähnliche Überlegungen lagen auch den Untersuchungen von W r b a ⁴⁴ zu Grunde, der an Tumorzellen mit Hilfe radioaktiver Phosphorverbindungen Vitalitätsbestimmungen durchführte.

In unserem Fall muss allerdings von Anfang an Klarheit darüber herrschen, dass eine erhöhte Phosphataktivität im untersuchten Gewebe nicht unbedingt mit einem verstärktem Wachstum gleichzusetzen ist, sondern nur für eine allgemeine Stoffwechselaktivierung spricht. Diese Einschränkung ergibt sich aus der Tatsache, dass die Phosphorsäure als ubiquitäres Stoffwechselprodukt an den verschiedenartigsten Reaktionen beteiligt ist. Eben das Problem einer allgemeinen Stoffwechselaktivierung durch bestimmte Organzellen schien aber zunächst das primäre.

Eine spezifischere Aussage über Wachstumsvorgänge müsste durch den Einbau markierter Nucleinsäurevorstufen, wie markiertem Adenin- C^{14} oder markierter Orotsäure, in das Gewebe möglich sein.

II. Material und Methode

A) Arbeitsmethodik für eine vergleichende Gewebezüchtung im Uhrglasverfahren

Als Methode der Gewebezüchtung wurde ein von F e l l ¹² angegebenes Kulturverfahren in Uhrglasschälchen benützt, das vor allem für Studien des embryonalen, also des organisierten Wachstums überhaupt geeignet ist. Das zu züchtende Gewebe wird dabei in einen festen Plasma-Nährsubstrat-Boden, der sich in einem Uhrglasschälchen befindet, implantiert. Das Uhrglas wird in eine Petrischale gegeben, die durch nasses Filtrierpapier oder feuchte Watte die Funktion einer "feuchten Kammer" ausübt.

Der Nährboden bestand aus einem Gemisch von Hühnchen-Embryonalextrakt mit Hühnerplasma und den einzelnen differierenden Zusätzen (siehe experimenteller Teil). Als Grundansatz bewährte sich ein Gemisch von 4 Tropfen Hühnchen-Embryonalextrakt, 3 Tropfen Plasma und 1 Tropfen wässriger Lösung von radioaktivem Phosphat (entsprechend ca. 0,24 μC). Die Variationsmöglichkeiten für die verschiedenen zu testenden Substanzen lagen im Bereich der 4 Tropfen Embryonalextrakt. Die Testansätze waren dann z.B. 2 Tropfen Embryonalextrakt,

2 Tropfen Testlösung, 3 Tropfen Plasma und 1 Tropfen Phosphatlösung.

Die einzelnen Nährbodenflüssigkeiten wurden mit Hilfe besonderer Pipetten (feinst ausgezogene Glasröhrchen) auf das Uhrglasschälchen gegeben und anschliessend sorgfältig vermischt, um Konzentrationsgefälle auszugleichen. Nach dem Festwerden des Nährbodens erfolgte die Implantation der Gewebepartikelchen. Dabei wurden jeweils drei Stückchen auf den erstarrten Nährboden gesetzt. Mindestens sechs Proben wurden immer unter den gleichen Nährbodenbedingungen gehalten.

Als Versuchsmaterial diente Gewebe verschiedener Organe erwachsener, weisser Ratten vom Albinotyp, bzw. Organgewebe der entsprechenden Embryonen. Die einzelnen Organe wurden steril entnommen, in eiskalter Hanks-Lösung zweimal gewaschen und auf einer Glasplatte mit zwei Messern soweit zerkleinert, dass der grösste Teil der Partikelchen nahezu die gleiche Grösse hatte. Die Gewebestückchen wurden nochmals in Hanks-Lösung aufgeschwemmt, gewaschen und aus der Menge die Stückchen gleicher Grösse aussortiert. Diese Gewebeteilchen mit einem Durchmesser von ca. 1 mm kamen dann zur Verwendung.

Die Kulturen wurden bei 37,5 Grad im Brutschrank jeweils 48 Stunden gehalten und anschliessend nach folgender Methode

aufgearbeitet:

Die noch im Nährboden sitzenden Gewebestückchen werden mit je einem Tropfen 0,2% iger, wässriger Versenat-Lösung (zur besseren Auslösung aus dem Nährboden geeignet) überschichtet, explantiert und dann je, dem Ansatz entsprechend, sechs Stück für 5 Minuten in 5 ml Hanks-Lösung gegeben. Anschliessend wird auf einer Fritte mit 50 Tropfen Hanks-Lösung unter Absaugen nachgewaschen, um eventuell noch äusserlich anhaftendes radioaktives Phosphat zu entfernen. Alle Ansätze werden dabei unter streng identischen Bedingungen aufgearbeitet.

Die jeweils zusammengehörenden Gewebestückchen werden dann in Gruppen zu sechs Stück auf einem Coca Cola - Kronenkorken im Geiger-Gerät auf ihre Aktivität geprüft. Ein besonderer Aufschluss durch Veraschung oder mit rauchender Salpetersäure erwies sich als unnötig, da ein gewisser Messfehler sich in allen Portionen verhältnismässig fort-pflanzt.

Als Indikatorelement wurde bei allen Versuchen P^{32} in Form von trägerfreiem Orthophosphat benutzt. Es handelt sich bei diesem Isotop um einen β -Strahler mittlerer Intensität (1,69 MeV) mit einer Halbwertszeit von 14,3 Tagen. P^{32}_{15} geht beim Zerfall in S^{32}_{16} über.

B) Die Gewinnung der Testsubstanzen

1. Die Gewinnung der Organhomogenisate

Als Organhomogenisate seien im Weiteren Suspensionen von embryonalen Rattenorganen bezeichnet, die durch Homogenisieren der Organe im Potter - Elvehjem - Homogenisator und anschliessendem Aufschlännen in der gleichen Volumenmenge Hanks-Lösung gewonnen wurden. Die Auslösung der Embryonen erfolgte, nach Tötung des Muttertieres durch Genickschlag, unter streng sterilen Kautelen. Die einzelnen Organe wurden entweder gleich homogenisiert oder in eiskalter Hanks-Lösung für maximal 30 Minuten aufbewahrt.

2. Die Gewinnung radioaktiver Organhomogenisate

Trächtige Tiere wurden vier Tage lang mit je 100 μ C radioaktivem Phosphat gespritzt und die Embryonen am fünften Tag entnommen. Die Bereitung der Homogenisate erfolgte, wie oben angegeben.

3. Die Gewinnung der Testseren

Erwachsenen Ratten eines einheitlichen Stammes wurden nach oben angeführter Methode gewonnene Organhomogenisate intraperitoneal injiziert. Pro Tier wurden jeweils 0,5 ml Suspension verimpft. Als Injektionsmaterial dienten ausschliesslich Homogenisate embryonaler Organe, da u.a. T e i r und

R a v a n t i ³⁷ gezeigt hatten, dass Injektionen junger Organe stärker mitoseauslösend wirken als die alter Organe. Nach vier Tagen wurde den Tieren in Äthernarkose Blut durch Herzpunktion entnommen und daraus das Serum durch Zentrifugieren gewonnen. Als Leber-Serum sei das Serum bezeichnet, das von Tieren erhalten wird, die mit Leber-Homogenisaten gespritzt wurden, als Leber-Placenta-Serum, das durch Injektion von Leber- und Placenta-Homogenisaten gewonnene Serum. Normalserum ist das Serum unbehandelter Tiere.

III. Experimentelle Ergebnisse

A) Allgemeine Versuche über die Aufnahme von radioaktivem Phosphat durch Organe in der Gewebekultur

Als Erstes sei das Ergebniss der Versuche vorgelegt, die Aufschluss geben sollten, inwieweit Organpartikelchen in der Gewebekultur überhaupt radioaktives Phosphat aufnehmen.

Die Werte der Tabelle I (Seite 16) geben darüber hinaus noch Einblicke in die unterschiedlichen Verhältnisse bei erwachsenen und embryonalen Organen.

Tabelle I

Die Aufnahme von radioaktivem Phosphat durch verschiedene Organe in der Uhrglaskultur

Nährboden: 3 Trpfn. Hühner-Plasma, 2 Trpfn. Embryonal-Extrakt,
2 Trpfn. Hanks-Lösung, 1 Trpfn. Phosphat-Lösung (ca.
0,24 μC)

E = Organ eines erwachsenen Tieres

e = Organ eines Embryos

Zahlen = gemessene Impulse pro zwei Minuten

Leber		Niere		Herz		Tumor
E	e	E	e	E	e	
297	655	723	1701	824	429	209
380	737	360	986	938	309	214
156	504			558	221	
257	523			433	193	
189	320					

Die in Tabelle I zusammengefassten Messergebnisse zeigen, dass die einzelnen Gewebestückchen kräftig Phosphat aus dem Nährmedium aufnehmen. Für die einzelnen Organe ist die Intensität der Aufnahme aber sehr verschieden. Besonders deutlich ist der Unterschied zwischen den embryonalen und den erwachsenen

Organen. Addiert man die einzelnen Werte, so zeigt die embryonale Rattenleber im Durchschnitt eine um ca. 114%, die embryonale Rattenniere eine um ca. 150% stärkere Aufnahme als die entsprechenden erwachsenen Organe. Interessant sind die Verhältnisse beim Rattenherzen: hier findet man die wesentlich höheren Werte beim erwachsenen Organ. Die letzte Spalte zeigt die Aufnahme von Phosphat durch einen spontanen Rattentumor in der Gewebekultur.

Um Aufschluss darüber zu bekommen, inwieweit die Aufnahme von radioaktivem Phosphat durch die Organkulturen eine reelle Stoffwechselleistung ist und nicht auf etwaige Adsorptionseffekte zurückzuführen ist, wurden Versuche unternommen, deren Messergebnisse in Tabelle II vorgelegt sind.

Tabelle II

Die Hemmung der Aufnahme von radioaktivem Phosphat durch Monojodessigsäure bzw. durch Erhitzen der eingesetzten Organe.

Nährboden: 3 Trpfn. Hühner-Plasma, 1 Trpfn. Phosphat-Lösung (ca. 0,24 μC). Die Substrat-Embryonalextrakt-Variationen sind oberhalb der einzelnen Messwerte angeführt.

Extrakt = Hühnchen-Embryonalextrakt, Hanks = Hanks-Lösung, Jodessg. = Jodessigsäure-Lösung. Zahlen davor bedeuten Trpfn.

E = Organ eines erwachsenen Tieres

e = Organ eines Embryos Jodessigsäurekonzentration = 10^{-4}

Leber				Tumor	
4 Extrakt		4 Extrakt		2 Extrakt	
normal		erhitzt		2 Extrakt	
				2 Hanks	
E	e	E	e	E	e
		2 Jodessg.		2 Jodessg.	

162	665	0	25	53	152	209	73
-----	-----	---	----	----	-----	-----	----

Zahlen = Impulse pro zwei Minuten

Wie Tabelle II zeigt, nehmen Organe, die vorher in Suspension 10 Minuten gekocht wurden, kein, bzw. nur minimal Phosphat auf. Der Zusatz von Monojodessigsäure, einem Hemmstoff der Glycolyse, zum Nährmedium lässt den Einbau von radioaktivem Phosphat beim erwachsenen Organ auf 29,5% und beim embryonalen Organ auf 22,6% absinken. Der Tumor zeigt analoge Verhältnisse. Diese Ergebnisse verweisen eventuelle Adsorptiv-effekte in eine bedeutungslose Rolle.

Während der Versuche mit Rattenherzkulturen zeigte sich eine gewisse Abhängigkeit der bei den einzelnen Proben inkorporierten Aktivität von der Zeit, die zwischen Organentnahme und Einbringen in die Organkultur vergangen war. Um diesen Befund zu sichern wurden Versuche unternommen, deren Ergebnis in Tabelle III und Figur I vorgelegt ist.

Tabelle III

Die Abhängigkeit der Aufnahme von radioaktivem Phosphat von der Zeit zwischen Organentnahme und Beginn der Organkultur beim erwachsenen und embryonalen Rattenherzen.

Nährboden: 3 Trpfn. Hühner-Plasma, 2 Trpfn. Hühnchen-Embryonal-Extrakt, 2 Trpfn. Hanks-Lösung, 1 Trpfn. Phosphat-Lösung (ca. 0,24 uC)

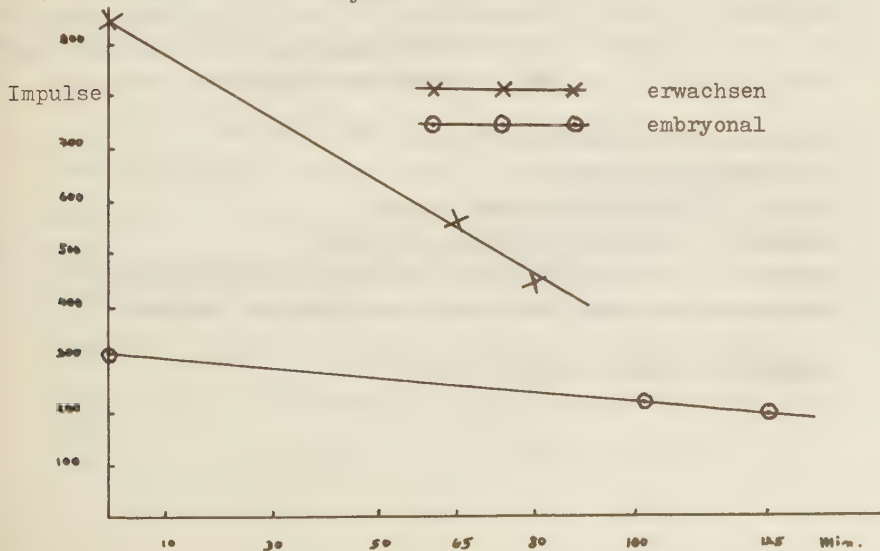
Erwachsenes Herz			Embryonales Herz				
Nach	0	65	80	0	100	125	Min.
Impulse pro zwei Minuten							
	938	558	433	309	221	193	

Die Messwerte der Tabelle III zeigen deutlich die Abhängigkeit der Aktivitätsaufnahme von den einzelnen Aufbewahrungszeiten. Nach 65 Minuten bzw. 80 Minuten nimmt das erwachsene Rattenherz nur noch 59,5% bzw. 46,2% des Nullwertes, das embryonale Herz nach 100 Minuten bzw. 125 Minuten nur mehr 72% bzw. 62,2% des Nullwertes an Aktivität auf.

Figur I gibt einen graphischen Überblick über die Abhängigkeit der Aktivitätsaufnahme von der Aufbewahrungszeit. Im geprüften Messbereich erscheint die Aufnahme von radioaktivem Phosphat als lineare Funktion der Zeit, die zwischen Organentnahme und Beginn der Organkultur vergangen ist.

Figur I

Die Abhängigkeit der Aufnahme von radioaktivem Phosphat von der Zeit zwischen Organentnahme und Beginn der Organkultur beim erwachsenen und embryonalen Rattenherzen.



B) Die Beeinflussung der Aufnahme von radioaktivem Phosphat in Kulturen erwachsener und embryonaler Rattenleber durch Homogenisate und Präparate embryonaler Organe

Die hier zusammengefassten Versuchsreihen sollen einen Einblick geben, inwieweit sich der Phosphatstoffwechsel von Gewebekulturen durch Zusätze embryonaler Provenienz beeinflussen lässt.

Zunächst wurde die Wirkung von Zusätzen embryonaler Leber-Homogenisate auf Kulturen erwachsener und embryonaler Leber studiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle IV wiedergegeben.

Tabelle IV

Die Beeinflussung der Aufnahme von radioaktivem Phosphat in Kulturen erwachsener und embryonaler Rattenleber durch Homogenisate embryonaler Rattenleber

Nährboden: 3 Trpfn. Hühner-Plasma, 1 Trpfn. Phosphat-Lösung(ca. 0,24 uC). Die Substrat-Embryonalextrakt-Variationen sind oberhalb der einzelnen Messwerte angeführt.

E = Organ eines erwachsenen Tieres

e = Organ eines Embryos

Extrakt = Hühnchen-Embryonalextrakt

L-Homog. = Homogenisat embryonaler Leber

L-Homog. = hitzedenaturiertes Homogenisat embryonaler Leber

Zahlen vor den einzelnen Substraten bedeuten Tropfen

Messwerte: siehe folgende Seite

Legende zur Tabelle: siehe Seite 20

4 Extrakt		2 Extrakt		2 Extrakt	
-----		2 L-Homog.		2 L-Homog.	
				denatur.	
E	e	E	e	E	e
Impulse pro zwei Minuten					
190	383	92	179		
292	442	131	260		
65	244	22	65		
326	851	41	118	359	636
292	442	71	299	344	725

Die Gegenüberstellung der Messwerte zeigt eine deutlich ausgeprägte Depression in der Aufnahme von Aktivität gegenüber den Nullwerten (nur Extrakt) bei Zugabe von Homogenisaten embryonaler Leber. So sinken z.B. bei der erwachsenen Leber die Aktivitäten im Durchschnitt von 100% auf 31%, bei der embryonalen Leber von 100% auf 38% ab.

Da die Vermutung nahe lag, dass dieser Effekt auf eine Mitbeteiligung der Homogenisate am Phosphatstoffwechsel des Nährmediums und damit auf ein für das eigentliche Explantat vermindertes Phosphatangebot zurückzuführen ist, wurden in einem Teil der Versuche die zellulären Anteile des Leber-Homogenisates durch Erhitzen in Suspension zerstört. Wie die letzte Rubrik der Tabelle IV zeigt, wird hierdurch der vorher beobachtete depressive Effekt wieder aufgehoben.

Die am Fussende der Tabellen angegebenen Prozentwerte sind nur Orientierungszahlen und nur in Verbindung mit den Einzelwerten zu betrachten.

Die in Tabelle V vorgelegten Messergebnisse bestätigen nun als erstes die in der vorhergehenden Versuchsreihe gemachte Beobachtung. Die Zugabe von nativen Placenta-Homogenisaten zum Nährmedium verursacht - hier allerdings nur am erwachsenen Organ beobachtet - eine starke Aktivitätsverminderung in den Kulturen. Durch Erhitzen der Homogenisate lässt sich eine ausgeprägte Zunahme an aufgenommener Aktivität hervorrufen. Beim embryonalen Organ folgt auf den Zusatz von Placenta-Homogenisaten keine Depression, sondern in jedem Fall eine deutliche Aktivitätszunahme (bei Zugabe von Humanplacenta bis zu 97%). In den Versuchen der letzten Spalte ist die Wirkung von Nabelschnur-Gemisch (NG) getestet. Die positive Wirkung auf den Phosphatstoffwechsel der Gewebekulturen ist hier besonders ausgeprägt.

Verschiedene pharmazeutische Firmen bringen seit einigen Jahren Organpräparate auf den Markt. Es lag nahe auch den Einfluss derartiger Präparate auf Gewebekulturen zu untersuchen. Leber- und Placenta-Trockenzellen, sowie eiweissarme, nucleotidreiche Präparate aus embryonalen bzw. jugendlichen Organen wurden nun den gleichen Versuchsbedingungen unterworfen wie die selbstbereiteten Organ-Homogenisate.

Die Messergebnisse der Versuche mit handelsüblichen Or-

Aus den Werten der Tabelle VI geht hervor, dass die Ansätze mit embryonalen Organen besonders gut auf die einzelnen Zusätze ansprechen.

Um Aufschluss darüber zu gewinnen, ob und in welchem Masse eventuell ausser dem angebotenen anorganischen radioaktiven Phosphat auch andere, vielleicht höhermolekulare Phosphatträger in die Organkultur aufgenommen werden, wurden Untersuchungen mit radioaktiven Organhomogenisaten angestellt. Die Bereitung der radioaktiven Organhomogenisate erfolgte nach der in Kapitel II angeführten Methode.

Die Angaben der Tabelle VII (Seite 26) zeigen nun, dass kein nennenswerter Übertritt von Aktivität aus dem radioaktiven Homogenisat in das Explantat eintritt, obgleich Messungen am gesamten Nährboden starke Aktivitäten aufzeigen. Wird zusätzlich noch radioaktives Phosphat zum Nährboden gegeben, so findet man ähnliche Verhältnisse wie beim Arbeiten mit nicht-radioaktiven Homogenisaten.

In einer Versuchsanordnung, die zwei Explantate erwachsener Leber in einem Nährmedium mit drei Stückchen normaler erwachsener Leber konfrontierte, konnte nach zwei Tagen keinerlei Aktivität in den normalen Leber-Explantaten ermittelt werden.

Tabelle VII

Die Beeinflussung der Aufnahme von Radioaktivität in Kulturen erwachsener und embryonaler Rattenleber durch radioaktive Organhomogenisate.

Nährboden: 3 Trpfn. Hühner-Plasma.

Die übrigen variierenden Nährbodenkomponenten sind oberhalb der einzelnen Messwerte angeführt.

E = Leber einer erwachsenen Ratte

e = Leber eines Rattenembryos

Extrakt = Hühnchen-Embryonalextrakt

Phos. = Lösung von radioaktivem Phosphat (ca. 0,24 μ C)

Le.ra. = radioaktives Leberhomogenisat erhitzt, wenn

Pl.ra. = radioaktives Placentahomogenisat vorher denaturiert

Zahlen vor den einzelnen Substraten bedeuten Tropfen

4 Extrakt	2 Extrakt	2 Extrakt	2 Extrakt	2 Extrakt	2 Extrakt	2 Extr.
-----	2 Le.ra.	2 Le.ra.	2 Le.ra.	2 Le.ra.	2 Pl.ra	2 Pl.ra
		erhitzt		erhitzt		erhitzt
1 Phos.			1 Phos.	1 Phos.		

E	e	E	e	E	e	E	e	E	e	E	e	E	e
296	442	28	34	14	31	71	299	344	725	18	13	15	11

Impulse pro zwei Minuten

C) Die Aufnahme von radioaktivem Phosphat in Kulturen erwachsener und embryonaler Rattenorgane und ihre Beeinflussung durch das Serum von Ratten, die mit Homogenisaten embryonaler Rattenorgane vorbehandelt worden waren.

Der eigentliche Modellversuch einer Untersuchung über die Wirkungen transplantierte Organe oder injezierter Organhomogenisate auf die korrespondierenden Organe eines Lebewesens musste die Austestung des Serums von Tieren sein, die mit Organhomogenisaten vorbehandelt worden waren. In den bisherigen Versuchen wurde nur der direkte Einfluss von Homogenisaten embryonaler Organe auf Gewebekulturen studiert, der lebende Organismus als " Zwischenwirt " war völlig eliminiert worden.

Die Gewinnung des Serums für die im Folgenden angeführten Versuchsreihen ist in Kapitel II geschildert.

Tabelle VIII (Seite 28) fasst die Messergebnisse der Versuche mit Kulturen erwachsener und embryonaler Rattenleber und der Beeinflussung ihres Stoffwechsels durch Leberserum bzw. Leber-Placenta-Serum zusammen.

Tabelle VIII

Die Beeinflussung der Aufnahme von radioaktivem Phosphat in Kulturen erwachsener und embryonaler Rattenleber durch Leber-serum bzw. Leber-Placenta-Serum.

Nährmedium: 3 Trpfn. Hühner-Plasma, 1 Trpfn. Phosphat-Lösung(ca. 0,24 uC). Die Substrat-Embryonalextrakt-Mengen sind oberhalb der einzelnen Messwerte angeführt.

E = Leber einer erwachsenen Ratte, e = Leber eines Rattenembryos
Extrakt = Hühnchen-Embryonalextrakt

No-Ser. = Normal-Serum (siehe Seite 14-15)

Le-Ser. = Leber-Serum (")

LP-Ser. = Leber-Placenta-Serum (")

Zahlen vor den einzelnen Zusätzen bedeuten Tropfen

4 Extrakt		2 Extrakt		2 Extrakt		2 Extrakt	
-----		2 No-Ser.		2 Le-Ser.		2 LP-Ser.	
E	e	E	e	E	e	E	e
Impulse pro zwei Minuten							
558	619	513	601	443	1146	241	709
41	140	500	976	1304	1300	991	1423
65	244	38	84	86	149	127	209
351	471	393	550	425	516	400	597
291	530	261	646	180	526	198	516
255	553	286	227	398	562	248	651
162	665	510	557	559	660	516	700
-	-	426	102	358	267	313	422
383	343	341	418	466	-	597	549
Gegen 4 Extrakt							
				:	+81% +44%	+57%	+48%
Gegen Normalserum							
				:	+30% +40%	+12%	+37%

Die in Tabelle VIII vorgelegten Messwerte zeigen einen deutlichen Einfluss der getesteten Seren auf die Aktivitäten der Gewebekulturen, insbesondere auf den Stoffwechsel der embryonalen Organe. So findet sich dort eine Aktivitätssteigerung von ca. 40% für Leber-Serum und von ca. 37% für Leber-Placenta-Serum gegenüber dem Normal-Serum. Bezogen auf den Ansatz mit 4 Teilen Hühnchen-Embryonalextrakt als Normal-Ansatz liegen die einzelnen Werte: + 44% für Leber-Serum und + 48% für Leber-Placenta-Serum. Beim erwachsenen Organ ist die Zunahme gegenüber dem Normal-Serum nicht so stark ausgeprägt (+ 30% für Leber-Serum und + 12% für Leber-Placenta-Serum). Bezieht man auf den Ansatz mit 4 Teilen Hühnchen-Embryonalextrakt, so errechnen sich Werte von + 81% für Leber-Serum und + 57% für Leber-Placenta-Serum.

Um zu sehen, in welchem Masse den durch Leber- bzw. Leber- und Placentainjektion gewonnenen Seren organspezifische Wirkungen zukommen, wurde Leber-Serum bzw. Leber-Placenta-Serum auch gegen Nieren- und Herzgewebe getestet. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle IX und X vorgelegt.

Die Werte (Seite 30 und 31) lassen keinen deutlich positiven Einfluss von Leber- bzw. Leber-Placenta-Serum auf Kulturen von Rattennieren und -herzen erkennen. Eher scheint sich eine gewisse depressorische Beeinflussung auszudrücken, die besonders bei den Versuchen mit Rattenherzen in Erscheinung

tritt. Ob allerdings gerade in diesem Fall eine echte negative Wirkung der Seren die Ursache ist, muss nach den in Tabelle III und Figur I vorgelegten Werten noch in Frage stehen. Die geringe zeitliche Differenz der einzelnen Ansätze dürfte allerdings keineswegs so ausgeprägt ihren Ausdruck finden.

Tabelle IX

Die Beeinflussung der Aufnahme von radioaktivem Phosphat in Kulturen erwachsener und embryonaler Rattenniere durch Leber-Serum und Leber-Placenta-Serum.

Nährboden: 3 Trpfn. Hühner-Plasma, 1 Trpfm. Phosphat-Lösung (ca. 0,24 uC). Die Substrat-Embryonalextrakt-Mengen sind oberhalb der einzelnen Messwerte angeführt.

E = Niere einer erwachsenen Ratte, e = Niere eines Rattenembryos
Extrakt = Hühnchen-Embryonalextrakt

No-Ser. = Normal-Serum (siehe Seite 14-15)

Le-Ser. = Leber-Serum (")

LP-Ser. = Leber-Placenta-Serum (")

Zahlen vor den einzelnen Zusätzen bedeuten Tropfen

4 Extrakt		2 Extrakt		2 Extrakt		2 Extrakt	
		2 No-Ser.		2 Le-Ser.		2 LP-Ser.	
E	e	E	e	E	e	E	e
Impulse pro zwei Minuten							
128	400	105	591	115	534	131	546
600	1149	364	1245	370	1207	422	1140
		304	981	231	1007	202	1187
		325	813	216	804	269	1258
		333	945	279	1078	240	940

Gegen Normal-Serum : -15% +1,4% -11% +10%

Tabelle X

Die Beeinflussung der Aufnahme von radioaktivem Phosphat in Kulturen erwachsener und embryonaler Rattenherzen durch Leber-Serum und Leber-Placenta-Serum.

Nährmedium: 3 Trpfn. Hühner-Plasma, 1 Trpfn. Phosphat-Lösung(ca. 0,24 uC). Die Substrat-Embryonalextrakt-Mengen sind oberhalb der einzelnen Messwerte angeführt.

E = Herz einer erwachsenen Ratte

e = Herz eines Rattenembryos

Extrakt = Hühnchen-Embryonalextrakt

No-Ser. = Normal-Serum (siehe Seite 14-15)

Le-Ser. = Leber-Serum (")

LP-Ser. = Leber-Placenta-Serum (")

Zahlen vor den einzelnen Zusätzen bedeuten Tropfen

2 Extrakt		2 Extrakt		2 Extrakt	
2 No-Ser.		2 Le-Ser.		2 LP-Ser.	
E	e	E	e	E	e
597	319	613	334	572	312
819	328	622	251	330	101
732	233	658	287	547	252
744	253	568	234	563	203

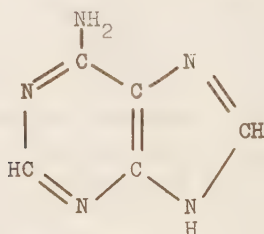
Gegen

Normal-Serum : -15% -2,4% -30% -24%

D) C¹⁴-markiertes Adenin als Testsubstanz für wachsende Gewebekulturen

Auf die sehr allgemeine Stellung der Phosphorsäure im Stoffwechselgeschehen der Zelle wurde schon in Kapitel I hingewiesen. Das Arbeiten mit radioaktivem Phosphat als Testsubstanz erlaubt noch keine sichere Aussage über das Wachstum von Organen.

Da Wachstum mit der Neubildung von Nucleinsäuren verbunden ist, könnte ein spezifischer Nucleinsäure-Test grössere Aussagekraft über die tatsächliche Neubildung von Gewebe besitzen. Nucleinsäuren bauen sich nun aus Purin- bzw. Pyrimidinbasen, Ribose- bzw. Desoxyribosemolekülen und Phosphorsäure auf. Diese einzelnen Stoffe können auch zugleich als Vorstufen dienen. Radioaktives Phosphat wurde bei den bisher beschriebenen Versuchen benutzt, doch nimmt eben die Phosphorsäure nicht nur am Nucleinsäure-Stoffwechsel teil. Auf der Suche nach einer zweckmässigeren Nucleinsäure-Vorstufe fiel die Wahl auf das C¹⁴-markierte Adenin.



Adenin

Orientierende Vorversuche zeigten, dass nach Zugabe von C^{14} -markiertem Adenin zum Nährboden von Gewebekulturen, ein deutlicher Übertritt von Aktivität aus dem Nährmedium in die Gewebeexplantate stattfindet.

E) Versuche zum Ausbau einer exakten Messmethode von Rollerkulturen

Alle bisher vorgelegten Versuchsergebnisse wurden nach der eingangs beschriebenen Methode gewonnen, der, durch verschiedene Faktoren bedingt, immer ein mehr oder weniger grosser Ungenauigkeitsfaktor anhängt.

Die Hauptfehlerquellen dieser Methode sind:

1. nicht vollkommen gleiche Gewebemengen,
2. nicht vollkommen gleiche Gewebestückchen,
3. nicht vollkommen gleiches Einsinken der Gewebestückchen in das Nährmedium,
4. nicht vollkommen gleiches Nährmedium.

Trotz dieser Unsicherheitsfaktoren bot aber die eingangs beschriebene Methode vorläufig die einzige Möglichkeit wenigstens zu qualitativ vergleichbaren Aussagen zu kommen. Mehrere gleiche Versuchsansätze sollten dann zu einer grössenordnungsmässig richtigen quantitativen Aussagemöglichkeit führen. Die

vorgelegten Messergebnisse besitzen deshalb auch überwiegend qualitativen Charakter.

Im Folgenden seien Versuche zum Ausbau einer exakten Messmethodik für Rollerkulturen beschrieben. Zumindest drei der oben angeführten Hauptfehlerquellen werden bei dieser Methode weitgehend eliminiert.

Quantitative Arbeitsmethode für vergleichende Gewebezüchtung in einer Rollerkultur.

Prinzip: Ein auf der Innenseite mit Gewebepartikelchen be-

legtes Stückchen Glasrohr von ca. 150 mm Länge und einem Durchmesser von ca. 12 mm läuft in einer besonders konstruierten Glastube in der Rollerapparatur. Jede Umdrehung des Rollers verursacht eine Drehung des Glasrohrstückchens um seine Längsachse und gewährleistet hierdurch eine gleichmässige Bespülung der Gewebestückchen mit Nährflüssigkeit.

a) Steril entnommene Organe werden mit Hanks-Lösung gewaschen und in kleine Stückchen zu ca. 100 - 200 mg zerlegt. Diese Stückchen werden nochmals gewaschen und in einer feuchten Kammer (Petrischale mit Uhrglas auf feuchtem Filtrierpapier) mittels einer Schere soweit zerkleinert, dass ein homogener Brei mit einer Partikelgrösse von ca. $\frac{1}{2}$ mm Durchmesser entsteht. Der Gewebebrei verbleibt bis zu seiner Ver-

wendung in der " feuchten Kammer " .

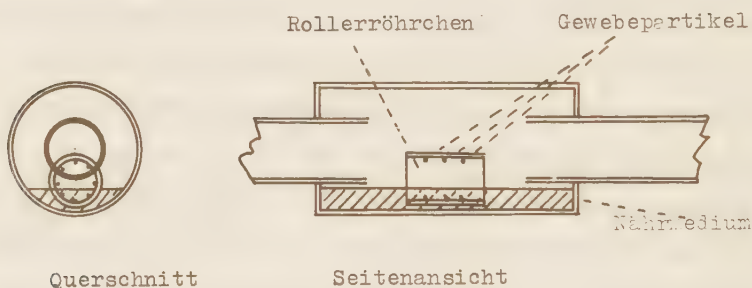
b) Die einzelnen Glasrohrstückchen werden einer Analysenwaage (z.B. Mettlerwaage) abgewogen, die Innenseite mit ca. 10 - 20 mg Gewebebrei bestrichen und dann nochmals gewogen. Aus der Differenz ergibt sich so die aufgetragene Menge an Gewebe. Die belegten Rollerröhrchen werden dann ebenfalls in einer feuchten Kammer vorläufig aufbewahrt.

c) Auf die Innenseite der so vorbehandelten Röhrchen bringt man anschliessend je einen Tropfen Hühner-Plasma und 3 Tropfen Hühnchen-Embryonalextrakt zur Fixierung des Gewebes an der Glaswand. Bis zur Gerinnung des Plasma-Embryonalextrakt-Gemisches müssen die einzelnen Glasröhrchen um ihre Längsachse rotieren, um die Ausbildung eines gleichmässigen Plasma - mantels zu gewährleisten. Man erreicht dies durch ständiges Rollen der Röhrchen in einer flachen Petrischale, die hin und her gekippt wird.

d) Die auf diese Weise präparierten Glasröhrchen werden in die auf Seite 36 abgebildete Rollertube eingeführt, anschliessend flüssiges Nährsubstrat einpipetiert und das Ganze in die Rollerapparatur eingesetzt. Das verbrauchte Nährmedium kann im Bedarfsfalle leicht durch frisches Medium ersetzt werden. Die für einen Versuch benötigten Mengen Nährflüssigkeit sind gering (z.B. 0,5 ml).

Figur II

Glastube für vergleichende Stoffwechseluntersuchungen in der Rollerkultur.



Querschnitt

Seitenansicht

Die bisher mit dieser Methode erhaltenen Ergebnisse entsprechen noch nicht ganz den Anforderungen, die an eine wirklich zuverlässig arbeitende Methode für vergleichende Untersuchungen an Gewebekulturen vielleicht gestellt werden müssen. Die Streuwerte der bisherigen Versuche liegen noch bei ca. 25%. Grössere Streuungen werden durch die noch sehr unvollkommenen und ungleichmässig gebauten Rollertuben hervorgerufen. Schon geringe Volumendifferenzen wirken sich natürlich auf den Flüssigkeitsspiegel und damit auf die Bepflügelung des Gewebes mit Nährmedium sehr stark aus. Durch eine exaktere Übereinstimmung der einzelnen Glastuben kann diese Fehlerquelle sicher beseitigt werden.

IV. Diskussion der Versuchsergebnisse

Die einleitenden Versuche sollten einen Überblick geben, inwieweit anorganisches radioaktives Phosphat überhaupt in Gewebekulturen aufgenommen wird. Obwohl von vornherein anzunehmen war, dass eine gewisse Aktivität aus dem Nährmedium in das Gewebe übertritt - denn der Austausch von Stoffen bildet ja den " äusseren Stoffwechsel " und damit die Grundlage einer Gewebekultur - so waren die an den einzelnen Gewebestückchen gemessenen Aktivitäten doch zunächst überraschend, vor allem bei Berücksichtigung des benützten Mediums, einem Plasma-Nährboden, in dem sich Austauschreaktionen nur in einer halbfesten Phase vollziehen können. Die gefundenen hohen Aktivitäten lassen sich nur mit einer verhältnismässig uneingeschränkten Beweglichkeit des relativ kleinen Phosphations im Nährmedium erklären, die durch die Schwammstruktur des Nährbodens gegeben scheint.

Mit zunehmender Molekülgrösse ist auch eine verminderte Beweglichkeit und damit ein geringerer Übergang von Molekülen bzw. Molekülkomplexen aus dem Nährmedium in das Gewebe zu erwarten. Die geringen Aktivitäten in den Explantaten der Untersuchungen mit radioaktiven Homogenisaten (Tabelle VII) finden wahrscheinlich hierin ihre Erklärung. In diesen radio-

aktiven Organpräparaten ist die Phosphorsäure überwiegend nur Bestandteil höhermolekularer Verbindungen und Aggregate, wie vor allem von Nucleotiden, Nucleinsäuren und Nucleoproteiden, deren Beweglichkeit in einem halbfesten Medium je nach Grösse gegen Null konvergiert. Wie einschlägige Versuche von **L e t t r é** und **W r b a** ²² mit radioaktiven Mitochondrien für die Tumorzelle gezeigt haben, werden in einem geeigneten Medium (z.B. wässriger Suspension) selbst von der intakten Zelle höhermolekulare Komplexe aufgenommen.

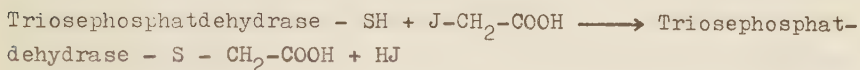
Die Versuche mit Monojodessigsäure als Hemmstoff der Glycolyse (Tabelle II) zeigen deutlich die verminderte Stoffwechselleistung der Gewebekulturen unter dem Einfluss dieser Substanz. Die Phosphataktivität sinkt auf ein Drittel bis ein Viertel der ursprünglich gemessenen Werte ab.

Die hemmende Wirkung der Jodessigsäure beruht auf ihrer irreversiblen Reaktion mit physiologisch notwendigen SH-Verbindungen nach folgendem Schema:



Freie SH - Gruppen und ihre Bedeutung für die katalytische Aktivität sind heute für eine grosse Anzahl von Fermenten gesichert. Besonders die Triosephosphatdehydrase, ein Enzym der Glycolysekette, erwies sich als sehr empfindlich gegen Mono-

jodessigsäure. H o l z e r ²⁰ konnte z.B. nach Zugabe von Jodessigsäure zu einer Aufschwemmung von Mäuse-Ascitestumorzellen eine Hemmung der aeroben Glycolyse bis zu 90% beobachten. Dem Mechanismus der Hemmung liegt folgende Reaktion zu Grunde:



Mit Jodessigsäure vorbehandelte Mäuse-Ascitestumorzellen zeigten Wachstumshemmungen bis zu 100% (H o l z e r ²⁰).

Das interessante Ergebnis der Tabelle I (Seite 16) ist die grundsätzlich verschiedene Phosphorsäure-Stoffwechselintensität der erwachsenen und embryonalen Organe, sowie der einzelnen Organe untereinander. Während man allgemein für embryonale Organe, bedingt durch ihre grössere Wachstumstendenz, eine höhere Stoffwechselleistung fordert, zeigen die Versuche mit Rattenherz-Kulturen inverse Verhältnisse. Der Stoffwechsel des embryonalen Rattenherzens beträgt, gemessen an der aufgenommenen Radioaktivität, nur ca. die Hälfte des erwachsenen Organs. Auch scheint der Phosphorsäure-Stoffwechsel des Rattenherzens, besonders der des erwachsenen Herzens, empfindlicher gegen äussere Einflüsse (siehe z.B. Tabelle III und Figur I) zu sein als der anderer Organe. Vielleicht lässt sich dies

mit dem hohen ATP-Bedarf des Herzens in Zusammenhang bringen, da bei ATP-Mangel sichtbare Strukturveränderungen der Zelle auftreten, die wiederum andere Stoffwechselstörungen zur Folge haben (u.a. R a a f l a u b ³³). In Mangelsituationen, wie z.B. bei längerem Aufbewahren in künstlichem Milieu, wird die Zelle stärker auf ihren Vorrat an energie-reichen Verbindungen zurückgreifen müssen. Organe mit hohem ATP-Stoffwechsel sind deshalb wahrscheinlich gegenüber Milieuveränderungen besonders anfällig.

Die in Teil B des Kapitels III vorgelegten Versuche sind in der Absicht unternommen worden, den tierischen Organismus als " Zwischenwirt " und damit als biologischen Unsicherheitsfaktor auszuschliessen und den direkten Einfluss von Zellen embryonaler Organe auf Gewebekulturen zu untersuchen.

Leider ist die Aussagekraft dieser Untersuchungen durch die aktive Beteiligung der Homogenisate am Gesamtstoffwechsel der Gewebekultur etwas eingeschränkt. Trotzdem lassen sich einige wichtige Einblicke, besonders durch die Versuche mit Placenta-Homogenisaten, gewinnen. Während in den Versuchen mit Leberhomogenisaten auch mit hitzeinaktivierten Homogenisaten kein stoffwechselsteigernder Effekt nachgewiesen werden konnte - was natürlich das eventuelle Vorkommen eines

hitzeinstabilen Faktors nicht ausschliesst - haben die Untersuchungen mit Placenta-Homogenisaten einen deutlich positiven Einfluss gezeigt. Vollkommen in Erscheinung tritt dieser Effekt aber auch hier erst nach einer Hitze-Denaturierung des Homogenisates. Die Placenta scheint demnach einen hitzebeständigen Stoff bzw. Stoffgruppen zu enthalten, denen stoffwechsel-aktivierende Eigenschaften zukommen. Besonders deutlich wurde dies in den Versuchen mit Nabelschnurserum-Gemisch. Die in Frage kommende Substanz scheint artunspezifisch zu sein, da Humanplacenta-Homogenisate den gleichen Effekt zeigen. Dieser Befund, zusammen mit der Hitzebeständigkeit der induzierenden Verbindungen, lässt an einfach gebaute Hormone denken. In diesen Versuchen zeigt sich auch deutlich die bessere Ansprechbarkeit der embryonalen Kulturen auf die angebotenen Substrate. Das embryonale Organ mit seiner weitaus grösseren Wachstums- und damit Stoffwechseltendenz scheint auf zugesetzte Mangelsubstrate oder Induktionsstoffe viel leichter zu reagieren. Eine Beobachtung, welche die Befunde von G l i n o s und B a r t l e t t ¹⁵ bestätigt.

Die Versuchsreihe mit handelsüblichen Organpräparaten zeigt eine überraschend gute Ansprechbarkeit der Gewebekulturen auf diese Zusätze.

Die getesteten Trockenzellen sind gefriergetrocknete Organzellen, die in einer beigegebenen Lösung suspendiert werden. Durch den Prozess des Einfrierens und Wiederauftauens, sowie durch die anschliessende Suspendierung wird der grösste Teil der Zellen zerstört (G o e t z ^{17,18}). Die Ausschwemmung von Zellpartikelchen, Enzymen und Coenzymen in die Suspensionsflüssigkeit hat eine weitgehende Desintegration der enzymatischen Prozesse und damit ein Absinken der Stoffwechselaktivitäten zur Folge (L y n e n et al. ^{23,24}). Vielleicht beruht hierauf die Wirksamkeit der gefriergetrockneten Zellen auch ohne vorhergehende Hitzedenaturierung auf die Gewebekulturen.

Das zweite untersuchte Präparat ist nach Angaben der Hersteller ein zellfreies, eiweissarmes, nucleinsäuren- bzw. nucleotidreiches Produkt aus entsprechenden embryonalen oder jugendlichen Organen. Es soll über organspezifische Nucleoproteidkörper eine Reiz- bzw. Substitutionswirkung auf homologe Organe ausüben.

Eine endgültige Beurteilung dieser Präparate in ihrer Wirksamkeit auf Gewebekulturen ist schon deshalb schwierig, weil die Inhaltsstoffe der einzelnen Präparate nicht übersehen werden können.

Die Aufschlüsselung der Ergebnisse von Untersuchungen mit direktem Zusatz von stofflich so heterogenen Gewebe-Homogenisaten erfordert überhaupt ein Rechnen mit zahlreichen unbekannten Faktoren. Dies gilt vor allem auch für die Frage nach dem stoffwechsel-aktivierenden Agens. So hatten z.B. schon 1930 Untersuchungen von B ü n g e l e r an Organzellen gezeigt, dass die Zufuhr von Proteinen ^{3,4}, von Reizkörpern und Antigenen ⁵ eine Vergrößerung des Atmungsquotienten zur Folge hat. Selbst die Resorption kolloidal gelöster Farbstoffpartikelchen, wie z.B. nach Zugabe von Tusche, führt zu einer erhöhten Sauerstoffaufnahme im aktivierten Mesenchym (B ü n g e l e r ⁶), ganz abgesehen davon, dass auch der Zusatz von Glucose oder anderen Substraten des Zellstoffwechsels unter Umständen eine starke Atmungsintensivierung zur Folge hat. Gesteigerte Aufnahme von Sauerstoff bedeutet aber auch immer einen gesteigerten Phosphat-Umsatz im Gewebe. Die innige Verflechtung beider Prozesse ist durch die Atmungskettenphosphorylierung gegeben.

Die Untersuchungen mit dem Serum zellvorbehandelter Tiere sollten nun Aufschluss darüber geben, inwieweit Injektionen von Organ-Homogenisaten Veränderungen im Organismus hervorrufen, die mit dem Auftreten organwirksamer Substanzen verbunden sind. Schon 1926 konnte B ü n g e l e r ⁷ den deutlichen Einfluss von parenteral zugeführtem Embryonalpresssaft auf das Blut (studiert am Blutbild) beim Kaninchen nachweisen.

Die Grundüberlegung für unsere Versuche war folgende:

Eine etwaige Auswirkung von injizierten Zellen auf ein Organ kann auf zwei verschiedenen Wegen möglich sein: entweder auf der Basis einer Substitutionswirkung (ähnlich einer Hormoninjektion) durch bestimmte Substanzen, wie z.B. Hormone oder auch Nucleoproteide bzw. deren Bausteine, die über die Blutbahn transportiert werden und dann ihre Wirkung am Empfängerorgan entfalten oder aber über den Mechanismus einer Art Antigen-Antikörper-Reaktion, bei der die Bildung bestimmter Substanzen durch die Injektion von Gewebematerial induziert wird. Welcher Weg nun auch der gegebene ist, auf jeden Fall muss das Serum der Träger einer eventuellen Wirksamkeit sein. Die Austestung dieser Substanzen in der Gewebekultur bot die Möglichkeit etwaige Wirkungen an einem Gewebe zu studieren, das keinerlei nervalen oder hormonalen Regulationen bzw. Gegenregulationen mehr unterliegt.

Als Ergebnis dieser Versuche mit dem Serum von Tieren, die mit Leber-Homogenisaten vorbehandelt worden waren, findet sich nun tatsächlich eine gewisse Wirksamkeit des Serums auf die Stoffwechselleistungen von Leberkulturen. Es scheinen nach einer Zellinjektion direkt - oder unter dem Einfluss der Zellen gebildet - Substanzen von stoffwechselaktivierendem Charakter im Blut aufzutreten. Interessant ist

auch die Beobachtung, dass Leber-Serum keine entsprechende Aktivierung bei Rattennieren- und Rattenherzkulturen herbeiführen scheint (Tabelle IX und Tabelle X). Dieser Befund legt einen organspezifischen Charakter der fraglichen Aktivatoren nahe und bestätigt die von anderen Autoren veröffentlichten Untersuchungsergebnisse (Blomquist², Teir und Ravanti³⁷, Friedrich-Frekša und Zaki¹³).

Obwohl die vorgelegten Versuchsergebnisse keinerlei Aussage über die Art der in Frage stehenden Substanzen und damit über den eigentlichen Wirkungsmechanismus zulassen, sei es doch gestattet gewisse physiologische Regenerationsvorgänge mit den Vorgängen nach einer Zellinjektion in Verbindung zu bringen: z.B. führt die Teilhepatektomie bei der Ratte zu ausgedehnten Regenerationsprozessen in der Leber. Der Anreiz zur Regeneration geht vermutlich von dem verbleibenden Gewebe aus, das heisst von einem Gewebe, das zum Teil noch selbst zerfällt und wahrscheinlich dadurch die Bildung bestimmter Regenerationskräfte induziert.

Wie verschiedene Autoren gezeigt haben, lässt sich auch hier der mitoseauslösende bzw. stoffwechselaktivierende Faktor im Serum des Tieres nachweisen. So führt z.B. die partielle Hepatektomie einer von zwei in Parabiose lebenden Ratten

zu einer erhöhten Mitosezahl auch in der Leber der nicht-operierten Ratte (Christensen und Jacobsen¹⁰, Bucher, Scott und Aub⁸, Wenneker und Susmann⁴³). Analog zu diesen Befunden zeigten die Versuche von Friedrich - Freksa und Zaki, dass sich durch das Serum hepatektomierter Ratten bei unbehandelten Ratten eine Mitosesteigerung in der Leber bis zum 40-fachen des Normalwertes auslösen lässt. Glinos¹⁴ konnte den aktivierenden Einfluss von Posthepatektomie-Serum auf Gewebekulturen nachweisen.

Vielleicht ist auch das zerfallende Gewebe eines bestimmten injizierten Organs der adäquate Reiz für das Auftreten von Substanzen im Blut, denen eine stoffwechselaktivierende und regenerationsfördernde Wirkung zukommt.

Unter diesem Aspekt gesehen wäre die Problematik einer " Organtherapie " eigentlich nur ein kleiner Ausschnitt aus der Problematik einer Relations- oder Regulationsphysiologie bzw. -Pathologie.

V. Zusammenfassung

1.) Gewebekulturen nehmen aus halbfestem Nährmedium deutlich zugesetztes radioaktives Phosphat auf. Embryonale Organe von Leber und Niere der Ratte zeigen eine wesentlich grössere, embryonales Rattenherz eine geringere Phosphorsäure-Stoffwechselintensität als die entsprechenden erwachsenen Organe. Die Menge des aufgenommenen radioaktiven Phosphats hängt beim erwachsenen und embryonalen Rattenherzen von der Zeit ab, die zwischen Organentnahme und Beginn der Organkultur vergeht.

2.) Kulturen erwachsener und embryonaler Rattenleber zeigen nach Zusatz von Homogenisaten embryonaler Rattenleber zum Nährmedium eine verminderte Aufnahme von radioaktivem Phosphat. Dieser Effekt kommt durch eine Mitbeteiligung des Homogenisats am Gesamtstoffwechsel der Gewebekultur zu stande. Ähnliche Beobachtungen werden nach Zugabe von Placenta-Homogenisaten zum Nährmedium gemacht. Werden hitze-denaturierte Placenta-Homogenisate zu Kulturen erwachsener und embryonaler Rattenleber gegeben so findet man eine deutliche Zunahme der Menge des aufgenommenen radioaktiven Phosphats gegenüber den Leerwerten. Diese Stoffwechselstimulierung ist wahrscheinlich auf nicht-eiweissartige, hitzestabile Substanzen von Hormoncharakter zurückzuführen.

3.) Die Zugabe von handelsüblichen Organpräparaten, wie gefriergetrockneten Organzellen oder zellfreier, eiweissarmer, nucleotidreicher Organpräparate zum Nährmedium von Gewebekulturen steigert die Aufnahme von radioaktivem Phosphat in die Explantate deutlich.

4.) Das Serum von Ratten, die mit Homogenisaten embryonaler Rattenleber vorbehandelt worden waren, verursacht eine verstärkte Aufnahme von radioaktivem Phosphat in Kulturen erwachsener und embryonaler Rattenleber. Die embryonale Leber wird dabei stärker aktiviert als die Leber erwachsener Tiere. Dieser Effekt scheint organspezifisch zu sein, da Leber-Serum keine Stoffwechselaktivierung auf Nieren- und Herzkulturen ausübt.

5.) Radioaktives Adenin-C¹⁴ wird in Gewebekulturen deutlich aufgenommen. Versuche mit radioaktivem Adenin-C¹⁴ besitzen eine stärkere Aussagekraft für ablaufende Wachstumsvorgänge als dies mit radioaktivem Phosphat als Indikator möglich ist.

6.) Die Entwicklung einer exakten Messmethode für vergleichende Untersuchungen in der Gewebekultur wird beschrieben.

VI. Literaturverzeichnis

- 1) Berthold, zitiert bei Marchand (27)
- 2) Blomquist, K: Acta Pathologica et Microbiologica Scandinav.
1947 Suppl. No CXXI
- 3) Büngeler, W: Frankf.Z.Path. 39,426 (1930)
- 4) Büngeler, W: Verhandl.D.Path.Ges. 25.Tagung, 125 (1930)
- 5) Büngeler, W: Z.ges.exp.Med. 75,223,263,287, (1931)
- 6) Büngeler, W: Frankf.Z.Path. 42,126 (1939)
- 7) Büngeler, W: Frankf.Z.Path. 34,350 (1926)
- 8) Bucher, N.L.R., Scott, J.F. und Aub, J.C: Cancer Res. 11,457
(1951)
- 9) Butenandt, A: Neuere Ergebnisse der biolog. Chemie in ihrer
Bedeutung für das Krebsproblem. Tirage à part
du volume " Tendances actuelles en gynécologie
et obstétrique " Georg et Cie. S.A Geneve 1955
- 10) Christensen, B.G. und Jacobsen, E: Acta med. scandiv. suppl.
234,101 (1950)
- 11) Felix, K: Münch.med.Wschr. 99,236 (1957)
- 12) Fell, H.B: J.Roy.Micr.Soc. 60,95 (1940)
- 13) Friedrich-Frekxa, H. und Zaki, F.G: Naturforsch. 9b,239(1954)
- 14) Glinos, A.D: Science 123,673 (1956)
- 15) Glinos, A.D. und Bartlett, E: Cancer Res. 11,164 (1951)
- 16) Glinos, A.D. und Gey, G.O: Cancer Res. 12,265, (1952)
- 17) Goetz, A: Naturw. 26,427 (1938)
- 18) Goetz, A: C. 1939,I.1184
- 19) Hevesy, G. und Ottesen, J: Acta Physiol. Scand. 5,237 (1943)
- 20) Holzer, H: Die Medizinische 15,576 (1956)

- 21) Huang-Mong-Luong und Tuen-tien-Hy: Origines de la Placento-
thérapie. Paris 1952
- 22) Lettré, H. und Wrba, H: Z.Krebsforsch. 60,80 (1954)
- 23) Lynen, F: Ann.Chem. 539,1 (1939)
- 24) Lynen, F. und Neciullah, N: Ann.Chem. 541,203 (1939)
- 25) Mc Junkin, F.A. und Breuhaus, H.C: A.M.A. 12,900 (1931)
- 26) Mc Junkin, F.A. und Matsui, T: A.M.A. 12, 784 (1931)
- 27) Marchand, F: Der Prozess der Wundheilung. Stuttgart 1901
- 28) Marshak, A. und Walker, A.C: Am.J.Physiol. 143,226 (1945)
- 29) Marshak, A. und Walker, A.C: Science 101,94 (1945)
- 30) Paracelsus: Von der Lunie. Traktat d. Philosophie III, Bd.IX
- 31) Parker, R.C: Methods of tissue culture. New York 1950
- 33) Raaflaub, J: Helv. physiol. Acta 10,C 22 (1952)
- 32) Plinius: Historia Naturae XVIII
- 34) Teir, H: Pathophysiological investigations. Commentationes
Biologicae XIII,1 (1951)
- 35) Teir, H: Growth 16,85 (1952)
- 36) Teir, H., Kiljunen, A. und Putkonen, T: Ann.chir.et.gynec.
Fenn. 40,61 (1951)
- 37) Teir, H. und Ravanti, K: Exper. Cell Research 5,500 (1953)
- 38) Teir, H., Voutilainen, A. und Kiljunen, A: Acta path. et
microbiologica Scandinav 34,417(1955)
- 39) Weiss, P: Science 115,487 (1952)
- 40) Weiss, P: On Biological Specifity and Growth. Princeton Uni-
versity Press 1955
- 41) Weiss, P. und Wang, H: Anat.Rec. 79, suppl. 2,62 (1941)

- 42) Weiler, E: Naturforschung 7b, 324 (1951)
- 43) Wenneker, A.S und Sussmann, W: Proc.Soc.Exper.Biol.a.Med.
76, 683, (1954)
- 44) Wrba, H: Habilitationsschrift München 1956
- 45) Wrba, H., und Seidler, E: Ztschr.f.Krebsforsch. 59, 693 (1954)
- 46) Zaki, F. G: Naturforschung 9b, 239, (1954)

Lebenslauf

Am 15.3.1926 wurde ich als Sohn des damaligen Verlegers Hanns Kalb und dessen Ehefrau Paula Kalb, geborene Eggers, in München geboren.

Nach Beendigung der Volksschulzeit besuchte ich das Alte Realgymnasium in München, wurde während der sechsten Klasse Flakhelfer und kam anschliessend zum Arbeitsdienst. Mit 18 Jären erfolgte meine Einberufung zur Luftwaffe, wo ich als Flugzeugführer ausgebildet wurde. 1945 kam ich in Gefangenschaft und nahm nach meiner Entlassung an einem Sonderlehrgang zur Erlangung des Abiturs teil. Nach einem halb-jährigen Wiederaufbaudienst an der Universität konnte ich im Sommer-Semester 1947 an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität München immatrikulieren.

Da ich fünf Semester am Chemischen Institut - wegen Totalfliegerschadens des Instituts - keinen Arbeitsplatz bekommen konnte, füllte ich diese Zeit mit einem allgemein-naturwissenschaftlichen Studium aus. Im Mai 1953 unterzog ich mich dem Diplomchemiker-Hauptexamen und arbeitete anschliessend unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. F. Lynen am Biochemischen Institut der Universität an meiner Diplomarbeit.

Im Winter-Semester 1954 inskribierte ich an der Medizinischen Fakultät der Universität München und legte im Winter-Semester 1955 die ärztliche Vorprüfung ab.

Im Juni 1957 promovierte ich zum Dr. rer. nat.

Im Frühjahr 1959 unterzog ich mich dem medizinischen Staatsexamen und promovierte anschliessend zum Dr. med.

